

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 01157388 A

(43) Date of publication of application: 20.06.89

(51) Int. Cl

C12N 15/00

(21) Application number: 62312102

(71) Applicant: MITSUBISHI HEAVY IND LTD

(22) Date of filing: 11.12.87

(72) Inventor: NAKAYAMA HIROYUKI

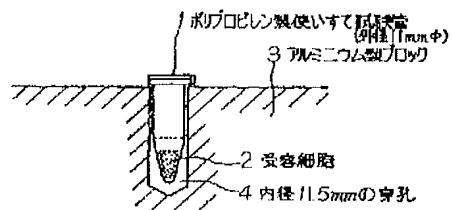
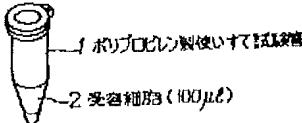
(54) TRANSFORMER METHOD

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

(57) Abstract:

PURPOSE: To prevent deterioration of receptor cell of freezer storage, by thawing a receptor cell in a plastic type throwaway test tube, carrying out transforming treatment of the thawed cell and applying heat pulse required for the transforming treatment to the test tube using a heat source of high-temperature solid.

CONSTITUTION: A receptor cell 2 of Escherichia coli. bacterium previously treated with calcium chloride is poured into a throwaway test tube 1 several times at an amount of e.g. about 100ml per time and frozen and stored. When transforming treatment is carried out, receptor cell 2 of the above-mentioned plastic throwing test tube is thawed and then transforming treatment is carried out and heat pulse required for the transforming treatment is applied to the test tube 1 by a heat source of high-temperature solid. To be concrete, the above-mentioned treatment is carried out by inserting the test tube 1 into a bored hole 4 of heated block 3 made of aluminum and retaining the heating for prescribed time.



⑪日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

平1-157388

⑬Int.Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 15/00

識別記号

序内整理番号

A-8412-4B

⑭公開

平成1年(1989)6月20日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮発明の名称 形質転換方法

⑯特 願 昭62-312102

⑰出 願 昭62(1987)12月11日

⑲発明者 中山 博之 兵庫県高砂市荒井町新浜2丁目1番1号 三菱重工業株式会社高砂研究所内

⑳出願人 三菱重工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番1号

㉑代理人 弁理士 内田 明 外3名

明細書

1. 発明の名称

形質転換方法

2. 特許請求の範囲

形質転換操作に先立ち予め塩化カルシウム処理した大腸菌の受容細胞を、一回使用量ずつプラスチック製使い捨て試験管に分注して凍結保存しておき、形質転換操作を行うに当つては、該プラスチック製使い捨て試験管の受容細胞を解凍した後形質転換操作を行い、形質転換操作に必要な熱パルスを高温固体の熱源によつて該プラスチック製試験管に印加することを特徴とする形質転換方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は大腸菌の形質転換法に関する。

〔従来の技術〕

大腸菌の形質転換には塩化カルシウム処理による受容細胞を用いる方法が一般的である。この時、従来は形質転換に先立つて作成した受容

細胞をバイアル瓶中に凍結保存しておき、形質転換操作を行ひ際にこれを解凍し、使用量(1回約0.1~0.2ml)をガラス製試験管に取り、残りの受容細胞は再凍結保存することが行われている。

そして形質転換操作において、受容細胞へDNA懸濁液を混合し0℃で保持した後、水浴を用いて37ないし45℃への急速な加熱をすることが行われる。これを熱パルスの印加といい、形質転換において重要な操作である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

従来の方法では、形質転換操作を行うごとに保存された受容細胞の解凍、凍結を繰り返すことになり、受容細胞の形質転換効率がしだいに低下する傾向が見られる。また解封、分注操作を繰り返し行うことになるので、操作が繁雑であり、またその間ににおける雑菌による汚染も問題になる。

そこで本発明者は受容細胞を1回使用量ずつに受容細胞を小容量のプラスチック製ふた付き

使いいて試験管に分注保存し更にこの試験管中で形質転換操作を行うことを考えたが、従来の加熱法に従つて熱パルス印加をすると、プラスチック製試験管壁は、ガラス製試験管壁に比べ伝熱抵抗が大きいため、内部の受容細胞の良好な急速加熱ができず、形質転換の効率が非常に低下してしまうばかりでなく、保存性の良好な小容量のプラスチック製試験管は外形が小さいため水浴で加熱すると水浴の水による内部受容細胞試料の汚染を受けやすく、かえつて従来法以上に雑菌汚染を起こしやすいという問題が生じた。

## 〔発明の目的〕

本発明は上記プラスチック製試験管による螺旋試験管による形質転換反応を合目的に行える方法を提供しようとするものである。

## 〔問題点を解決するための手段〕

すなわち本発明は形質転換操作に先立ち予め塩化カルシウム処理した大腸菌の受容細胞を、一回使用量ずつプラスチック製使い捨て試験管

操作手数を少なくできるため雑菌汚染も抑えられ、また操作の簡素化が避けられる。

さらに37～45℃の加熱目標温度よりも高温の熱源をプラスチック製試験管に接触させることにより伝熱速度を上げ、ガラス試験管よりも伝熱抵抗が大きいことを補つて内部受容細胞の良好な急速加熱を行い、またこの熱源として従来より用いられた水浴に替えて固体の熱源を用いることにより、受容細胞材料の水による汚染をなくすことができる。

## 〔実施例〕

常法の塩化カルシウム法に従い作成した大腸菌HB 101株の受容細胞の1.6%グリセロール、1M塩化カルシウム懸濁液を外径1.1mmの滅菌したプラスチック製フタ付試験管(1.5ml容)に100μlずつ分注し-80℃で凍結保存した。この状態を第1図に示す。第1図において、1はポリプロピレン製使い捨て試験管、2は受容細胞を示す。

凍結した試験管の内の一一本を取り氷中で解凍

に分注して凍結保存しておき、形質転換操作を行なうに当つては、該プラスチック製使い捨て試験管の受容細胞を解凍した後形質転換操作を行い、形質転換操作に必要な熱パルスを高温固体の熱源によつて該プラスチック製試験管に印加することを特徴とする形質転換方法である。

本発明においては、例えば、受容細胞を一回使用分、100μlずつ使い捨てプラスチック製試験管に無菌的に分注、凍結保存し、使用時にはこれを解凍し、更にこの使い捨て試験管内において以降の形質転換操作を行うこととし、形質転換において重要な熱パルス印加を加熱の目標温度よりも高温の固体の熱源によつて行うことにより従来の問題点を解消すると共に操作の簡略化を図るものである。

## 〔作用〕

保存された受容細胞の内の使用される分だけが取り出され、解凍されるため、残りの受容細胞が劣化するおそれがあるが極めて少ない。また、形質転換操作において試料が接触する機器の数、

し、この受容細胞液にプラスミドDNA PBR 322 の5μg/ml懸濁液を2μl加え、0℃で1時間静置した。

次に、第2図に示すように、この試料の入ったガリブロビレン製使い捨て試験管1を、68℃に保つたアルミニウム製ブロック3の内径1.1.5mmの穿孔4内に挿入し、2分間保持した。この間に試験管1内部は42℃まで温度上昇した。

この後、第1表に示す2XYT液体培地800μlを加え、37℃で30分間前後培養した後、抗生素質アンピシリンを選択マーカーとして常法に従い形質転換体を得、その形質転換効率を調べたところ、プラスミドPBR 322 DNA 1μgあたり $1 \times 10^7$ 個の形質転換体であつた。これは従来法による作成直後の受容細胞と同じである。

第1表

BACTO トリプトン (DIFCO 製)	16%
BACTO 酵母エキス (DIFCO 製)	10%
塩化ナトリウム	5%
水	1L

更に、上記方法で作成し3ヶ月間凍結保存した受容細胞での形質転換効率を調べたところ、その値は作成直後と差がなく、受容細胞が長期間安定に保存されることが確かめられた。

また、この間ににおいて雑菌による汚染は認められなかつた。

#### [発明の効果]

本発明により凍結保存された受容細胞の劣化および雑菌汚染を抑えることができると共に操作の簡略化が図れる。

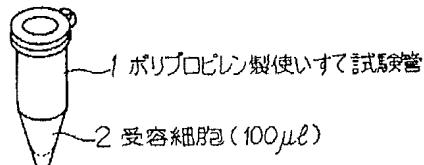
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一実施例としてのプラス

チック製試験管に凍結保存した受容細胞の状態を示す説明図、第2図は、本発明の一実施例としてのアルミニウム製ブロックを用いたプラスチック製試験管の加热の状態を示す説明図である。

代理人	内田 明
代理人	荻原 亮一
代理人	安西 雄夫
代理人	平石 利子

第1図



第2図

